

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)



(51) Clasificación Internacional de Patentes⁵ : C07K 15/10, 3/02, A61K 37/02		A1	(11) Número de publicación internacional: WO 94/20540 (43) Fecha de publicación internacional: 15 de Septiembre de 1994 (15.09.94)	
(21) Solicitud internacional: PCT/ES94/00020 (22) Fecha de la presentación internacional: 2 de Marzo de 1994 (02.03.94)		de Acuña, 27-5º G, E-Valladolid (ES). MARTINEZ DE BENITO, Fernando [ES/ES]; Puente Colgante, 16-1º, E-Valladolid (ES).		
(30) Datos relativos a la prioridad: P 9300408 2 de Marzo de 1993 (02.03.93) ES P 9300409 2 de Marzo de 1993 (02.03.93) ES		(74) Mandatario: UNGRIA LOPEZ, Javier; Ungria Patentes y Marcas, S.A., Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).		
(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD DE VALLADOLID [ES/ES]; Plaza Santa Cruz, 8, E-47002 Valladolid (ES).		(81) Estados designados: AU, CA, JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		
(72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): GIRBES JUAN, Tomás [ES/ES]; Hernando de Acuña, 27-5º G, E-Valladolid (ES). FERRERAS RODRIGUEZ, José, Miguel [ES/ES]; Miguel Delibes, 30-2º A, E-Valladolid (ES). IGLESIAS ALVAREZ, Rosario [ES/ES]; Miguel Delibes, 30-2º A, E-Valladolid (ES). CITOLES GONZALEZ, Lucía [ES/ES]; Fuente el Sol, 16-2º F, E-Valladolid (ES). ARIAS VALLEJO, Francisco, Javier [ES/ES]; San Pedro, 4-7º C, E-Valladolid (ES). ROJO RODRIGUEZ, M ^ª Angeles [ES/ES]; Navarra, 35, E-Palencia (ES). MUÑOZ MARTINEZ, Raquel [ES/ES]; Avenida de la Victoria, 1-3º A, E-Soria (ES). JIMENEZ LOPEZ, Pilar [ES/ES]; Hernando		Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i> <i>Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.</i>		
(54) Title: NON-TOXIC RIBOSOME INACTIVATING PROTEINS (RIPs) WITH TWO CHAINS, PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF AND APPLICATIONS				
(54) Título: PROTEINAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS (RIPs) DE DOS CADENAS NO TOXICAS, PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACION Y APLICACIONES				
(57) Abstract <p>The invention discloses ribosome inactivating proteins (RIPs) with two chains, which are not toxic in the extra-cellular environment, of plant origin, and capable of interacting with ribonucleic acid and causing the inhibition of the biosynthesis of proteins in cellular systems, said proteins being comprised of two chains A and B, chain A having a N-glucosidase activity of the ribosomal ribonucleic acid, and chain B having a lectine activity, both chains being joined by disulphide bridges. Among said proteins, Nigrine b isolated from bark of <i>Sambucus nigra</i> L., basic Nigrine 1 isolated from the leaves of <i>Sambucus nigra</i> L., Ebulin 1 isolated from leaves of <i>Sambucus ebulus</i> L. and Racemosine b isolated from the bark of <i>Sambucus racemosa</i> L. are mentioned. Said proteins find application as inactivators of the ribonucleic acid and as inhibitors of the protein synthesis, and are potentially useful in the therapy of cancer and AIDS.</p>				
(57) Resumen <p>Se describen proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de dos cadenas, no tóxicas en el ámbito extracelular, de origen vegetal capaces de interaccionar con el ácido ribonucléico y de provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas celulares y constituidas por dos cadenas A y B, de las cuales la cadena A posee actividad N-glucosidasa del ácido ribonucléico ribosómico y la cadena B posee actividad de lectina, unidas por puentes disulfuro. Entre dichas proteínas pueden mencionarse la Nigrina b aislada de la corteza de <i>Sambucus nigra</i> L., la Nigrina 1 básica aislada de las hojas de <i>Sambucus nigra</i> L., la Ebulin 1 aislada de hojas de <i>Sambucus ebulus</i> L. y la Racemosina b aislada de la corteza de <i>Sambucus racemosa</i> L. Dichas proteínas tienen aplicación como inactivadoras del ácido ribonucléico e inhibidoras de la síntesis de proteínas con potencial utilidad en la terapia del cáncer y del SIDA.</p>				

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	GB	Reino Unido	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Níger
BE	Bélgica	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BF	Burkina Faso	HU	Hungría	NO	Noruega
BG	Bulgaria	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelanda
BJ	Benín	IT	Italia	PL	Polonia
BR	Brasil	JP	Japón	PT	Portugal
BY	Belarús	KE	Kenya	RO	Rumania
CA	Canadá	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CF	República Centroafricana	KP	República Popular	SD	Sudán
CG	Congo		Democrática de Corea	SE	Suecia
CH	Suiza	KR	República de Corea	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kazajistán	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TG	Togo
CZ	República Checa	LV	Letonia	TJ	Tayikistán
DE	Alemania	MC	Mónaco	TT	Trinidad y Tabago
DK	Dinamarca	MD	República de Moldova	UA	Ucrania
ES	España	MG	Madagascar	US	Estados Unidos de América
FI	Finlandia	ML	Mali	UZ	Uzbekistán
FR	Francia	MN	Mongolia	VN	Viet Nam
GA	Gabón				

- 1 -

TITULO DE LA INVENCION

PROTEINAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS (RIPS) DE DOS CADENAS NO TOXICAS, PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACION Y APLICACIONES

5

CAMPO TECNICO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) las cuales impiden el funcionamiento ribosómico de manera catalítica por inactivación del ácido ribonucléico.

10

De forma más específica, la presente invención se refiere a nuevas RIPs de dos cadenas no tóxicas con potencial aplicación en la terapia del cáncer y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

15

ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR A LA INVENCION
En el reino vegetal existen algunas especies que contienen actividades inhibidoras de la biosíntesis de proteínas en sistemas derivados de organismos eucariontes, que son de naturaleza protéica y que a la espera de una definición bioquímica precisa se conocen con el nombre de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) (Gasperi-Campani y cols., Biochem. J. 186, 439-441 [1980]; Gasperi-Campani y cols., J.Nat. Prod. 48, 446-454 [1985]; Ferreras y cols., Cell. Mol. Biol. 35, 89-95 [1989; Merino y cols., J.Exp. Bot. 41, 67-70 [1990]; Girbes y cols.,

25

Cell. Mol. Biol., 38, 803-812 [1992]; Cidores y cols., Cell. Mol. Biol. 39, 885-995 [1993]; Stirpe y cols., Biotechnology 10, 405-412 [1992]; Cidores y cols., FEBS Lett., 329, 59-62 [1993]. Estas proteínas pueden ser de una cadena polipeptídica (de tipo 1), de dos cadenas polipeptídicas

30

(de tipo 2) o de cuatro cadenas polipeptídicas (de tipo 4) (Cidores y cols., FEBS Lett., 329, 59-62 [1993]). Las de una cadena polipeptídica son N-glucosidasas del ácido ribonucléico ribosómico (Stirpe y cols. Nuc. Acid Res. 16, 1349-1357 [1988]), mientras que las de dos cadenas tienen una N-glucosidasa del ácido ribonucléico ribosómico (cadena A) y

35

- 2 -

una lectina (cadena B) (Stirpe y cols., Biotechnology 10, 405-412 [1992]) que habitualmente reconoce restos de galactosa y sus derivados. Las proteínas de cuatro cadenas están formadas por dos dímeros del Tipo A-B (equivalentes cada uno a una molécula de tipo 2) (Cidores y cols., FEBS Lett. 329, 59-62 [1993]. Estas proteínas (A y B) tienen una masa molecular (Mr) entre 20000 y 34000. Las cadenas A impiden el funcionamiento ribosómico de manera catalítica por inactivación del ácido ribonucléico (Jimenez y Vázquez, Annu. Rev. Microbiol. 39, 649-672 [1985; Roberts y Selitrennikoff, Biosc. Rep. 6, 19-29 [1986]; Stirpe y Barbieri, FEBS Lett. 195, 1-8; [1986]; Stirpe y Cols. Biotechnology 10, 405-412 [1992]; Cidores y cols., FEBS Lett. 329, 59-62 [1993]; Girbés y cols., J. Biol. Chem. 268, 18195-18199 [1993]; Girbés y cols., Plant Mol. Biol. 22, 1181-1186 [1993]. La inactivación consiste en la liberación de una adenina del ARNr mayor del ribosoma (Endo y Tsurugi, J. Biol. Chem. 262, 8128-8130 [1987]; Stirpe y cols. Nucleic Acid Res. 16, 1349-1357 [1988]; Girbés y cols., J. Bacteriol. 175, 6721-6724; Iglesias y cols., FEBS Lett. 325, 291-294 [1993]; Iglesias y cols., FEBS Lett. 318, 189-192 [1993]. El papel biológico de estas toxinas en la planta que las produce es totalmente desconocido (Roberts y Selitrennikoff Biosc. Rep., 6, 19-29 [1986]. Estas proteínas son immunológicamente y químicamente diferentes unas de otras aunque guardan alguna homología secuencial en los aminoácidos del extremo aminoterminal, en particular cuando las toxinas pertenecen a la misma familia botánica (Montecucchi y cols., Int. J. Peptide Protein Res. 33, 263-267 [1989]; Arias y cols., Planta 186, 532-540 [1992].

El enorme interés de las proteínas inactivadoras de ribosomas reside en que se utilizan en la construcción de inmunotoxinas para terapia del cáncer (Vitetta y Uhr, Annu. Rev. Immunol. 3, 197-212 [1985]; Frankel y cols., Annu. Rev. Med. 37, 125-142 [1986]; Koppel, Bioconj. Chem., 1,

- 3 -

13-23 [1990], Lord, Plant Physiol. 85, 1-3; [1987]) y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Till y cols., Science 242, 1166-1168 [1988]; Ghetie y cols., Bioconj.Chem. 1, 24-31 [1990]; Kahn y cols., AIDS 4, 1197-1204 [1993]; Byers y cols., AIDS 4, 1189-1196 [1992]).

5 Muy recientemente se ha encontrado que al menos cuatro proteínas de esta familia (RIPs) poseen per se carácter inactivador del virus ARN HIV-1 que es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (McGrath y cols., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 2844-2848 [1989]; Lee-Huang y cols., FEBS Lett. 272, 12-18 [1990]; Lee-Huang y cols., Proc.Natl.Acad Sci.USA 88, 6570-6574 [1991]; Zarling y cols., Nature 347, 92-95 [1990]).

10 15 Las RIPs de tipo 2 y en particular la ricina se ha demostrado además que poseen actividad antitumoral (Barbieri y Stirpe, Cancer Surv. 1, 489-520 [1982]).

20 Sin embargo, la utilización de las RIPs tóxicas de una cadena o de las RIPs tóxicas de dos cadenas comporta importante desventajas, tal y como se pone de manifiesto en los párrafos siguientes:

25 Concretamente, las RIPs de dos cadenas existentes hasta el descubrimiento de la presente invención de las "RIPs de dos cadenas no tóxicas" eran: ricina, abrina, volkensina, viscumina y modecina [revisado en Stirpe y cols. Biotechnology 10, 405-412 (1992)]. Las cinco proteínas son extremadamente tóxicas por lo que su utilización en la construcción de inmunotoxinas e inmunoconjuga-
dos lleva a especies químicas altamente tóxicas de muy difícil aplicación terapéutica práctica.

30 Una forma de atenuar esta toxicidad es administrar la inmunotoxina formada con alguna de estas proteínas, generalmente ricina, conjuntamente con lactosa para reducir así la toxicidad inespecífica debida a la parte proteínica tóxica (por ejemplo ricina) en la inmunotoxina. La toxicidad de la inmunotoxina formada con ricina

- 4 -

5 bloqueada con lactosa y un anticuerpo frente a un antígeno de la célula diana es debida solo a la interacción de la parte anticuerpo de la inmunotoxina con el antígeno y posterior translocación de la inmunotoxina al interior celular [Spooner y Lord, Trends in Biotechnology 8, 189-193 (1990)].

10 Para eliminar la toxicidad inespecífica de ricina se ha procedido a inactivar parcialmente a la ricina por vía química, por mutagénesis dirigida o simplemente formando la inmunotoxina sólo con la cadena A de la ricina u otras RIPs tóxicas. Todas estas alternativas tienen como consecuencia la pérdida parcial de actividad de la ricina o la RIP tóxica de que se trate [Blattler y cols., Cáncer Cells 1, 50-55 (1989)]. Los experimentos más recientes que 15 se han publicado indican que la mejor forma de modificar la ricina es alterar por vía química la interacción de la cadena B de la ricina utilizando molécula de ricina intacta A-B, con D-galactosa [Lambert y cols., Cáncer Research 51, 6236-6242 (1991)]. Sin embargo la solución no es buena porque reduce notablemente la actividad de la cadena A 20 sobre la síntesis de proteínas de la célula diana [Lambert y cols., Cáncer Research 51, 6236-6242 (1991)].

25 En cuanto a las RIPs de una cadena, la mayor parte de ellas, aún siendo menos tóxicas que las de dos cadenas tóxicas, son relativamente tóxicas a las dosis que serían necesarias para alcanzar concentraciones plasmáticas adecuadas a la terapia [Stirpe y Cols. Biotechnology 10, 405-412 (1992)]. Además, al ser de menor tamaño que las de dos cadenas pueden ser atrapadas con mayor facilidad por el 30 hígado y los riñones por endocitosis fluida. Por otro lado las RIPs de una cadena son tóxicas para los macrofagos [Barbieri y Stirpe, Cáncer Surveys 1, 490-520 (1982)] y los trofoblastos [Chang y cols., Contraception 19, 175-184 (1979)].

- 5 -

expuestos, las RIPs de dos cadenas no tóxicas de la presente invención tienen la ventaja de que preservándose su carácter de extraordinario inhibidor de la síntesis de proteínas no puede entrar espontáneamente en la célula. En 5 otras palabras, la naturaleza ha hecho ya con las RIPs de dos cadenas no tóxicas lo que los Bioquímicos y Biólogos Moleculares intentan hacer con la ricina y otras RIPs de dos cadenas tóxicas. Por lo tanto su utilización a grandes 10 dosis no ofrece el peligro que ofrecen los conjugados con ricina u otras RIPs tóxicas de dos cadenas. Otra ventaja adicional es que utilizando inmunotoxinas formadas con RIPs de dos cadenas no tóxicas, la rotura del enlace o los 15 enlaces que mantienen unidas a la RIP y al anticuerpo con la consiguiente liberación de RIP no tóxica, no supone ningún riesgo en contraste con lo que sucedería si se liberase la ricina.

Dado que las proteínas son substancias antigénicas poderosas, para poder abordar cualquier tipo de terapia con ellas es necesario disponer de una batería de 20 dichas toxinas lo más amplia posible con el objeto de seleccionar la menos inmunorreactiva por un lado y por otro de poder substituir la toxina o la parte tóxica de la inmunotoxina según se van desarrollando anticuerpos neutralizantes en el paciente.

25

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de dos cadenas no tóxicas, a un procedimiento para su preparación y a sus aplicaciones.

30

Las mencionadas proteínas son nuevas toxinas vegetales de naturaleza protéica que, en base a sus propiedades químico-físicas y bioquímicas, se clasifican en el grupo de proteínas vegetales inactivadoras de ribosomas (RIPs) de tipo dos o de dos cadenas y se caracterizan por ser no tóxicas al ser inyectadas a ratones Swiss de 30 g.

35

- 6 -

a la dosis de 1,6 mg. por kg. de peso corporal.

La originalidad de la presente invención frente al estado de la técnica expuesto en el apartado anterior reside en la utilización de plantas no tóxicas para el aislamiento de las citadas RIPs de dos cadenas, en vez del empleo de plantas tóxicas, las cuales conducían a la obtención de las RIPs de dos cadenas tóxicas del tipo de la ricina, abrina, volkensina, viscumina y modecina anteriormente mencionadas.

Las nuevas proteínas no tóxicas, en el ámbito extracelular, de la presente invención están constituidas por dos cadenas, a saber, una cadena A con actividad N-glucosidasa del ácido ribonucléico ribosómico, en especial con actividad de N-glucosidasa del ácido ribonucléico 28S de ribosomas de mamíferos, y una cadena B con actividad de lectina, unidas por puentes disulfuro; caracterizándose dichas nuevas proteínas porque ligadas a una molécula transportadora (anticuerpo, hormona u otra proteína) reconocible por un receptor de membrana presente en la célula diana, permiten la actuación específica y selectiva de la cadena A sobre dichas células diana por inactivación del ácido ribonucléico de sus ribosomas, evitando substancialmente el ataque indiscriminado de dichas RIPs a células no seleccionadas por la molécula transportadora, precisamente por su carencia de toxicidad extracelular.

Las proteínas de la presente invención así definidas son capaces de interaccionar catalíticamente con el ácido ribonucléico y de provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares. Su poder inhibidor es muy superior a los inhibidores antibióticos no protéicos de la biosíntesis de proteínas (Pestka, S.(1977) Inhibitors of protein synthesis. En: Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis. Ed. H. Weissbach y S.Pestka. Academic Press.pp.468-553).

Adicionalmente, dichas proteínas presentan

- 7 -

actividad como N-glucosidasas del ácido ribonucléico ribosómico (ARN-r) y actividad aglutinante de eritrocitos humanos.

5 La extraordinaria potencia como inhibidor de la biosíntesis de proteínas y su efecto sobre el ácido ribonucléico, equivalente al ejercido por ejemplo por la PAP (pokeweed antiviral protein, Irvin Pharmacol.Ter. 21. 371-387 [1983], una proteína con actividad anti-VIH-1 (Zarling y cols. Nature 347, 92-95 [1990], confieren a 10 estas proteínas una enorme utilidad.

Las aplicaciones más importantes de las RIPS de dos cadenas no tóxicas de la presente invención son: como inactivadoras in vitro de ribosomas sensibles a la toxina, como inactivadoras in vitro del ácido ribonucléico ribosómico de mamíferos, como inhibidoras de la biosíntesis de proteínas en sistemas in vitro, como inhibidoras de biosíntesis de proteínas en células y tejidos acopladas a anticuerpos monoclonales frente a receptores específicos en dichas células y tejidos y como antivirales contra virus 15 ARN, en particular el VIH causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA).

Asimismo, a partir de dichas proteínas es posible la construcción de conjugados con otras especies químicas con la finalidad de inhibir la biosíntesis de 20 proteínas por inactivación in vivo de ribosomas de organismos eucariontes. En esta línea, dado que las RIPS de dos cadenas no tóxicas poseen una elevada actividad inhibidora de síntesis de proteínas en sistemas acelulares superior en casi todos los sistemas ensayados a la ricina intacta 25 [Girbés y cols., Journal of Biological Chemistry 268, 18195-18199 (1993); Girbés y cols., Planta Molecular Biology 22, 1181-1186 (1993)] y que administradas bien a células cultivadas intactas o a ratones Swiss de 30 g. no 30 son tóxicas, aún a concentraciones de 1,6 mg, por Kg. de peso corporal [Girbes y cols., Journal of Biological

- 8 -

Chemistry 268, 18195-18199 (1993); Girbés y cols., Plant Molecular Biology 22, 1181-1186 (1993)], si se transportan adecuadamente al interior celular la efectividad será mayor que la de la ricina. El transporte de proteínas al interior celular se consigue acoplándolas a transportadores adecuados como anticuerpos, hormonas y otras proteínas que puedan ser reconocidas por receptores específicos en la superficie celular y que puedan ser internalizados [Stirpe y cols. Biotechnology 10, 405-412 (1992)]; Barbieri y Stirpe, Cáncer Surveys 1, 490-520 (1982)].

También pueden utilizarse las RIPs de dos cadenas no tóxicas de la presente invención para inhibir la propagación funcional (in vivo y en células intactas aisladas) de ácido ribonucléico, en enfermedades provocadas o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido ribonucléico (virus ARN).

Finalmente, dichas proteínas, bien libres o bien en forma de conjugado con otras especies químicas, pueden utilizarse para inactivar células blanco específicas en seres humanos y animales de experimentación.

Por lo tanto, las RIPs de dos cadenas no tóxicas de la presente invención son potencialmente útiles para la terapia del cáncer y el SIDA.

El procedimiento general para la obtención de las RIPs de dos cadenas no tóxicas de la presente invención comprende el aislamiento de las mismas de plantas no tóxicas incluyendo unas primeras operaciones de extracción de la parte correspondiente de la planta con una solución acuosa a base de cloruro sódico y fosfato monosódico para obtener un extracto que (i) sea capaz de inhibir la síntesis de proteínas y (ii) tenga actividad aglutinante de eritrocitos humanos, seguido de concentración de los extractos y purificación de los mismos mediante técnicas de cromatografía de intercambio iónico y/o afinidad y de exclusión molecular.

- 9 -

Ahora bien, dentro del alcance general de las RIPs de dos cadenas no tóxicas de la presente invención es posible distinguir dos tipos, a saber, RIPs de dos cadenas no tóxicas de tipo ácido y RIPs de dos cadenas no tóxicas de tipo básico. Por lo tanto, los procedimientos de aislamiento de las mismas, aunque siguen el esquema general anteriormente expuesto tiene ciertas modificaciones debidas fundamentalmente a dicho carácter ácido o básico de las moléculas.

De acuerdo con lo anterior, el procedimiento para la obtención de las RIPs de dos cadenas no tóxicas de tipo ácido de la presente invención comprende las siguientes operaciones:

a) selección de una planta o parte de una planta no tóxica;

b) obtención del extracto protéico de dicha planta con cloruro sódico y fosfato monosódico;

c) selección de los extractos así obtenidos que cumplan con los dos requisitos siguientes:

(i) capaces de inhibir la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo; y

(ii) actividad aglutinante de eritrocitos humanos;

d) cromatografía de afinidad de los extractos que cumplen con los dos requisitos realizada sobre Sepharosa 6B tratada con ácido y elución con D-galactosa o lactosa;

e) cromatografía de exclusión molecular del pico de proteína de la etapa anterior;

f) obtención de los picos de proteínas conteniendo lectinas y RIPs de dos cadenas no tóxicas;

g) análisis de inhibición de la síntesis de proteínas de cada pico;

h) selección del pico que inhibe la síntesis de proteínas.

- 10 -

Por su parte, el procedimiento para la obtención de las RIPs de dos cadenas de tipo básico de la presente invención, comprende las siguientes operaciones:

5 a) selección de una planta o parte de una planta no tóxica;

b) obtención del extracto protéico de dicha planta con cloruro sódico y fosfato monosódico

c) selección de los extractos así obtenidos que cumplan con los requisitos siguientes:

10 (i) capaces de inhibir la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo; y

(ii) actividad aglutinante de eritrocitos humanos;

15 d) cromatografía de cambio iónico de las proteínas básicas de dichos extractos sobre S-Sepharose FF, seguida de elución con cloruro sódico.

e) diálisis del pico protéico obtenido en la etapa anterior;

20 f) segunda cromatografía de cambio iónico del dializado sobre CM-Sepharose FF;

g) selección de los picos de la etapa anterior que inhiben la síntesis de proteínas, seguido de concentración de los mismos con AMICON;

25 h) cromatografía de exclusión molecular del producto de la etapa anterior en HILOAD Superdex 75 con equipo FPLC para obtener las RIPs de dos cadenas no tóxicas de tipo básico.

Dentro de las RIPs de dos cadenas no tóxicas de la presente invención merecen una mención especial las aisladas de las plantas del género *Sambucus*.

Más concretamente entre las RIPs de dos cadenas no tóxicas de tipo ácido pueden citarse:

- Nigrina b aislada de la corteza de *Sambucus nigra* L; y

35 - Ebulina 1 aislada de hojas de *Sambucus*

- 11 -

ebulus L;
y entre las RIPs de dos cadenas no tóxicas de tipo básico
se incluyen:

5 - Nigrina l básica aislada de las hojas de
Sambucus nigra L.; y
- Racemosina b aislada de la corteza de
Sambucus racemosa L.

10 A continuación, se irá haciendo un análisis
más detallado de la naturaleza y propiedades de cada una de
estas proteínas, así como de sus procedimientos de obten-
ción:

NIGRINA b

15 La Nigrina b se aísle de la corteza de
Sambucus nigra L. mediante un procedimiento que se caracte-
riza por las siguientes etapas:

20 a) extraer la corteza de Sambucus nigra L.
previamente molida con una solución acuosa de NaCl y
NaPO₄H₂;

b) filtrar el extracto líquido resultante a
través de una malla y centrifugar el filtrado;

c) aplicar el fluido sobrenadante a una
columna cromatográfica para someterlo a un proceso de
cromatografía de afinidad, lavando la columna con un tampón
de extracción;

25 d) eluir la columna lavada con el tampón de
extracción conteniendo D-galactosa y recoger la fracción
protéica;

30 e) dializar y liofilizar la fracción proteíni-
ca obtenida y someterla a una cromatografía de exclusión
molecular previamente disuelta en NaCl NaH₂PO₄, rindiendo
el eluato tres picos, de los cuales el segundo de ellos
corresponde a la Nigrina b.

35 Mediante este procedimiento se obtiene la
Nigrina b en un estado de pureza final del 99% determinada
por electroforésis en gel de poliacrilamida en presencia de

- 12 -

dodecil-sulfato sódico (EGPA-SDS).

La cromatografía de la etapa (c) suele llevarse a cabo con un gel de Sepharose 6B (compuesto por una matriz de agarosa al 6%) tratado con ácido, normalmente HCl 0,1N durante unas 3 horas a unos 50°C, y equilibrando con un tampón de extracción.

Por su parte, la cromatografía de la etapa (e) suele llevarse a cabo con gel Superdex 75 HiLoad (compuesto por agarosa y dextrano).

La masa molecular relativa (Mr) de la Nigrina b así obtenida se determinó por electroforésis en geles de poliacrilamida, resultando ser de 26.000 para la cadena A y de 32.000 para la cadena B, en presencia de reductor y 58.000 en su ausencia.

La secuencia de aminoácidos del extremo aminoterminal de las dos cadenas polipeptídicas de la Nigrina b se determinó como se indica en Arias y cols. (Arias y cols; Planta 186, 532-540 [1992]). Los resultados obtenidos fueron:

- Cadena A:

Ile	Asp	Tyr	Pro	Ser	Val	Ser	Phe	Asn	Leu
1							5		10
Asp	Gly	Ala	Val	Ser	Ala	Thr	Tyr	Arg	Asp
							15		20

- Cadena B:

Asp	Gly	Glu	Thr	Xxx	Thr	Leu	Xxx	Thr
1								5

Ser	Phe	Thr	Arg	Asn	Ile	Val	Gly	Arg
10							15	
Asp	Gly	Leu	Xxx	Val	Asp			
					20			

(Xxx: significa que puede ser cualquier aminoácido).

Se ha comprobado que la Nigrina b, así

- 13 -

obtenida y caracterizada presenta tales y cada una de las propiedades y aplicaciones mencionadas anteriormente para las RIPs de dos cadenas no tóxicas, en general.

NIGRINA 1 básica

5 La Nigrina 1 básica se aísle de las hojas de *Sambucus nigra* L., mediante un procedimiento que se caracteriza por las siguientes etapas:

a) extraer las hojas de *Sambucus nigra* L. con una solución acuosa de NaCl y NaPO₄H₂;

10 b) filtrar la pasta resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado previamente acidulado;

c) someter el fluido obtenido previamente acidulado a una cromatografía de intercambio iónico, lavando primeramente la columna con acetato sódico y 15 después con fosfato monosódico;

d) eluir la columna lavada con una solución de cloruro sódico y fosfato monosódico y recoger la fracción protéica;

20 e) dializar la fracción protéica frente a fosfato monosódico y someterla a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica separándose las fracciones que contienen la Nigrina 1 básica;

25 f) someter las fracciones anteriores concentradas a cromatografía de exclusión molecular para obtener la Nigrina 1 básica.

La masa molecular relativa (Mr) de la Nigrina 1 básica así obtenida se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida, por el procedimiento Laemmly obteniéndose un valor de Mr de 66.000 en ausencia de 30 reductor y de 32.000 para la cadena A y 34.000 para la cadena B en presencia de reductor.

La secuencia de aminoácidos del extremo aminoterminal se determinó como se indica en Arias y cols. (Arias y cols.; Planta 186, 532-540 [1992]). Los resultados 35 obtenidos fueron los siguientes:

- 14 -

- Cadena A:

Aminoácido del extremo amino-terminal bloqueado.

- Cadena B:

5 Ala Pro Xxx Tyr Pro Thr Xxx Xxx
1 5

Se ha comprobado que la Nigrina 1 básica, así obtenida y caracterizada presenta todas y cada una de las propiedades y aplicaciones mencionadas anteriormente para 10 las RIPs de dos cadenas no tóxicas en general.

Ebulina 1

La Ebulina 1 se aísla de las hojas de la planta *Sambucus ebulus* L. mediante un procedimiento que se caracteriza por las siguientes etapas:

15 a) extraer la planta *Sambucus ebulus* L, (hojas), previamente molida con una solución acuosa de NaCl y NaPO₄H₂;

b) filtrar el extracto líquido resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado;

20 c) aplicar el fluido sobrenadante a una columna cromatográfica para someterlo a un proceso de cromatografía de afinidad, lavando la columna con un tampón de extracción;

d) eluir la columna lavada con el tapón de 25 extracción contenido D-galactosa y recoger la fracción protéica;

e) concentrar la fracción protéica y someterla a cromatografía de exclusión molecular equilibrando la columna con NaCl y NaH₂PO₄, rindiendo el eluato picos de 30 proteínas, de los cuales el último de ellos corresponde a Ebulina 1.

Mediante este procedimiento se obtiene la Ebulina 1 a un estado de pureza final del 99% determinada por electroforésis en gel de poliacrilamida en presencia de 35 dodecil-sulfato sódico (GPA-SDS).

- 15 -

La cromatografía de la etapa (c) suele llevarse a cabo con un gel de Sepharose 6B (compuesto por una matriz de agarosa al 6%) tratado con ácido, normalmente HCl 0,1N durante unas 3 horas a unos 50°C, y equilibrando con un tampón de extracción.

Por su parte, la cromatografía de la etapa (e) suele llevarse a cabo con un gel Superdex 75 HI Load (compuesto por agarosa y dextrano).

La masa molecular relativa (Mr) de la Ebulina 1 así obtenida se determinó por electroforésis en geles de poliacrilamida, resultando ser de 26.000 para la cadena A y de 30.000 para la cadena B en presencia de reductor y 56.000 en su ausencia.

La secuencia de aminoácidos del extremo aminoterminal de dichas cadenas son las siguientes:

- Cadena A:

Ile Asp Tyr Pro Ser Val Ser Phe Asn Leu Ala
1 5 10

Gly Ala Lys Ser Thr Thr Tyr Arg Asp Phe Leu
20 15 20

Lys Asn Leu

25

- Cadena B:

Asp Gly Glu Thr Xxx Ala Ile Pro Ala Pro Phe
25 1 5 10

Thr Arg Arg Ile Val Gly Xxx Asp Gly Leu Glu
15 20

Val Asp Pro

25

30 (Xxx significa que puede ser cualquier aminoácido)

Se ha comprobado que la Ebulina 1, así obtenida y caracterizada presenta todas y cada una de las propiedades y aplicaciones mencionadas anteriormente para las RIPs de dos cadenas no tóxicas en general.

- 16 -

Racemosina b

La racemosina b se aisla de la corteza de *Sambucus racemosa* L., mediante un procedimiento que se caracteriza por las siguientes etapas:

5 a) extraer corteza de *Sambucus racemosa* con una solución acuosa de NaCl y NaPO₄H₂;

b) filtrar la pasta resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado previamente acidulado;

10 c) someter el fluido obtenido, previamente acidulado, a una cromatografía de intercambio iónico, lavando primeramente la columna con acetato sódico y después con fosfato monosódico;

15 d) eluir la columna lavada con una solución de cloruro sódico y fosfato monosódico y recoger la fracción protéica;

e) dializar la fracción protéica frente a fosfato monosódico y someterla a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica, separándose las fracciones que contienen la Racemosina b;

20 f) someter las fracciones anteriores concentradas a cromatografía de exclusión molecular para obtener la Racemosina b.

25 La masa molecular relativa (Mr) de la Racemosina b así obtenida se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida por el procedimiento Laemmly (Nature 227, 680-685) obteniéndose un valor de Mr de 58.000 en ausencia de reductor y de 27.500 para la cadena A y de 29.500 para la cadena B en presencia de reductor.

30 Se ha comprobado que la Racemosina b así obtenida y caracterizada presenta todas y cada una de las propiedades y aplicaciones mencionadas anteriormente para las RIPs de dos cadenas no tóxicas, en general.

MODOS DE REALIZACION DE LA INVENCION

35 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, los cuales no preten-

- 17 -

den ser limitativos de su alcance.

EJEMPLO 1 (Nigrina b)

Este ejemplo se desglosa en ocho partes:

5 a) obtención de nigrina b a partir de corteza de *Sambucus nigra L.*, b) determinación de la masa molecular aparente; c) secuencia amino-terminal de las cadenas polipeptídicas de Nigrina b; d) actividad N-glucosidasa sobre el ARN; e) inhibición de la biosíntesis de proteínas; f) toxicidad en ratones; g) actividad hemaglutinante de 10 eritrocitos; h) relación inmunológica:

a) Obtención de Nigrina b

15.1 g de corteza de *Sambucus nigra L.* se molieron con 121 ml de solución 280 mM cloruro sódico y 5mM fosfato monosódico (pH 7,5) a 4°C durante 12 h. El extracto resultante se filtró a través de malla para queso para eliminar los sólidos remanentes. El extracto líquido se centrifugó a 13000 rpm en rotor JA-14 (centrifuga Beckman J21) durante 45 minutos y se recogió el sobrenadante (120.8 ml). El fluido sobrenadante se aplicó a una 20 columna cromatográfica (9 x 2.6 cm) cargada con Sepharose 6B tratada con ácido (50 ml de Sepharose 6B tratados con 0.1 N HCL durante 3 h. a 50°) equilibrada con tampón de extracción. A continuación se lavó la columna con tampón de extracción hasta que la absorbancia a 280 nm descendió 25 hasta la línea base.

Entonces se aplicó una solución de tampón de extracción conteniendo 200 mM D-galactosa. El pico de absorbancia (22.5 ml y una concentración protéica de 0.243 mg/ml) se recogió, se dializó frente a agua y finalmente se liofilizó rindiendo 7.2. mg de proteína. 5.2.mg de esta preparación de proteína se disolvieron en 0.6 ml de 400 mM NaCl y 5 mM fosfato sódico (pH 7.5) y se aplicaron en dos alícuotas de 0.3 ml cada una a una columna cromatográfica Superdex 75. Se recogieron fracciones de 0.5 ml y se obtuvieron tres picos. El segundo pico era Nigrina b

- 18 -

electroforéticamente homogénea.

b) Determinación de la masa molecular aparente de la Nigrina b.

La masa molecular relativa (Mr) se determinó por electroforésis en geles de poliacrilamida (15% acrilamida y 2,7% bis-acrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, EGPA-SDS) por el procedimiento de Laemmli (Nature 227, 680-685). Los valores de Mr obtenidos fueron de 26.000 para la cadena A y 32.000 para la cadena B, en presencia de reductor y de 58.000 en su ausencia.

c) Secuencia aminoterminal de las cadenas polipeptídicas de Nigrina b.

La secuencia amino-terminal de las dos cadenas polipeptídicas de la Nigrina b se determinó como se indica en Arias y cols, (Arias y cols; Planta 186, 532-540 [1992]. Los resultados obtenidos fueron:

- Cadena A:

Ile Asp Tyr Pro Ser Val Ser Phe Asn Leu
1 5 10

Asp Gly Ala Val Ser Ala Thr Tyr Arg Asp
15 20

Phe Leu Ser Asn

- Cadena B:

Asp Gly Glu Thr Xxx Thr Leu Xxx Thr

1 5

Ser Phe Thr Arg Asn Ile Val Gly Arg
10 15

Asp Gly Leu Xxx Val Asp
20

(Xxx: significa que puede ser cualquier aminoácido)

d) Actividad N-glucosidasa sobre ARN-r

La actividad N-glucosidasa de la Nigrina b se determinó como liberación del fragmento de ARN-r como consecuencia de la acción de la anilina en medio ácido

- 19 -

sobre el ARN-r depurinado por la Nigrina b. La liberación del fragmento de ARN-r se determinó incubando 100 μ l. de lisado de reticulocito de conejo con Nigrina b como se indica a continuación. 100 μ l de lisados de reticulocitos de conejo se incubaron con 0,8 μ g en solución conteniendo 2 mM MgCl₂, 10 mM ditiotreitol, 50 mM KCl y 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), durante 15 min. a 37°C. Despues el ARN-r se extrajo de estas mezclas de reacción con un volumen de fenol saturado de 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), en presencia de 10 mM EDTA. La extracción con fenol se realizó otras dos veces y finalmente el ARN-r se precipitó con dos volúmenes de etanol en solución 300 mM acetato sódico (pH 5.2), a -80°C durante 2h. A continuación se trató el ARN-r con 1 volumen de 2 M anilina (pH 4.5). La anilina se extrajo con éter dietílico (un volumen dos veces). El ARN-r se precipitó a continuación con dos volúmenes de etanol y 300 mM acetato sódico (pH 5.2). El análisis electroforético del fragmento liberado se realizó como sigue. El precipitado de ARN-r obtenido en la última etapa se resuspendió en agua. 3 μ g de ARN-r en tampón de electroforésis se colocaron en cada uno de los pocillos del gel de poliacrilamida (4.85% acrilamida y 0.150% de bisacrilamida preparado según Salustio y Stanley (J.Biol. Chem. 265, 582-588 [1992])). La electroforésis se llevó a cabo a 15 mA durante 100 min en un sistema de minigel (Mighty Small, Hoefer). El teñido del gel se realizó con 0,5 μ g/ml bromuro de etidio durante 20 min. La visualización se realizó con transiluminador de lámpara U.V. a 312 nm.

e) Inhibición de la biosíntesis de proteínas

Los estudios de inhibición de biosíntesis in vitro de proteínas se realizaron utilizando distintos sistemas acelulares en las condiciones standard descritas en las correspondientes referencias bibliográficas. Los resultados de un experimento típico se indican en la

- 20 -

Tabla 1.

TABLA 1

Efecto de la Nigrina b sobre la biosíntesis de proteínas
llevada a cabo por distintos sistemas acelulares.

	Sistema acelular	IC ₅₀ (ng/ml)	Ref. Bibliográfica
5	Lisados de reticulocitos	1.6	1
10	de conejo		
	hígado de rata	12.1	1
	germen de trigo	>100000	1
	germen de Vicia sativa L.	>100000	2
	cerebro de rata	2,3	1
15	Escherichia coli	>100000	3

Refs.: 1. Arias y cols. Planta 186, 532-540 [1992]; 2. Arias y cols, Phytochemistry 30, 3185-3187 [1991]. 3. Girbés y cols. Eur. J. Biochem. 67, 257-265 [1976].

20 IC₅₀ indica la concentración de proteína que provoca un 50% de inhibición de biosíntesis de proteínas en las condiciones standard de cada sistema acelular. Los experimentos se realizaron en las condiciones indicadas en las referencias bibliográficas.

25 f) Toxicidad en ratones.

Los estudios se llevaron a cabo en ratones de la raza Swiss de aproximadamente 30 g. de peso.

30 Se les inyectaron intraperitonealmente 1,6 mg de nigrina b por kg de peso corporal sin ocasionar ninguna muerte en el plazo de 15 días.

g) Actividad hemaglutinante de eritrocitos.

Los estudios de hemaglutinación se hicieron en placas de 96 pocillos utilizando una solución de eritrocitos al 0.5% en un volumen final de 0.1ml.

- 21 -

Aglutinación total de eritrocitos de sangre humana (mg por ml de proteína)

5

Grupos sanguíneos

10

	A	B	AB	O
Nigrina b	0.025	0.0125	0.0125	0.0125

15

h) Relación inmunológica

Anticuerpos policlonales obtenidos inmunizando conejos durante 1,5 meses con nigrina b reaccionan con nigrina 1 básica, ebulina 1 y racemosina b, dando idea de la relación inmunológica existente entre esta familia de proteínas obtenidas de plantas del género *Sambucus*.

20

EJEMPLO 2 (Nigrina 1 Básica)

Este ejemplo se desglosa en ocho partes:

25

a) obtención de Nigrina 1 básica a partir de las hojas de *Sambucus nigra* L.; b) determinación de la masa molecular aparente; c) secuencia amino-terminal de las cadenas polipeptídicas de Nigrina 1 básica; d) actividad N-glucosidasa sobre el ARN; e) inhibición de la biosíntesis de proteínas; f) toxicidad en ratones; g) actividad hemaglutinante de eritrocitos; h) relación inmunológica.

30

a) Obtención de nigrina 1 básica

500 g de hojas de *Sambucus nigra* L. se extrajeron con 4 l de solución 140 mM cloruro sódico y 5 mM fosfato monosódico (pH 7,2) a 4°C durante 12 h. La pasta resultante se filtró a través de malla para queso para eliminar los sólidos remanentes. El extracto líquido se acidificó a pH 4 con ácido acético glacial y los sólidos que aparecieron se eliminaron por centrifugación a 13.000 rpm durante 45 min a 0°C. El fluido eluido (aproximadamente 4 L) se sometió a cromatografía de intercambio iónico en S Sepharose Fast

35

- 22 -

Flow (columna de 10x5 cm). La solución de equilibrado de columna fue acetato sódico 10 mM (pH 4,5). El fluido protéico acidificado se aplicó a la columna. La parte no retenida a la columna se desechó. A continuación la columna se lavó con la solución de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) hasta que la absorbancia a 280 nm se redujo al mínimo. A continuación se lavó la columna con solución de fosfato monosódico 5 mM (pH 7). Los dos lavados se desecharon. Por último la columna se eluyó con solución 1 M de cloruro sódico y 5 mM de fosfato monosódico (pH 7). La proteína eluída se sometió a diálisis frente a 5mM de fosfato monosódico (pH 7). Esta preparación protéica se sometió a continuación a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica en CM-Sepharose Fast Flow (columna de 10.5x2.6 cm) preequilibrada con solución de fosfato monosódico (pH 7). Primero se fijó la proteína y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 0,7 l de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 7) y 0,7 l de solución 300 mM de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 7 ml por min y se recogieron fracciones de 10,5 ml. Se recogieron las fracciones 15 a la 35 que contenían la nigrina 1 básica. Se juntaron las fracciones y se concentraron con AMICON y membrana YM10 hasta un volumen de 10 ml. El concentrado se sometió a cromatografía de exclusión molecular en HiLoad Superdex 75-FPLC equilibrada con solución 0,4 M de cloruro sódico y 5mM de fosfato monosódico. La cromatografía se desarrolló en el mismo tampón, y las fracciones correspondientes a nigrina 1 básica se juntaron.

30

b) Determinación de la masa molecular aparente

35

La masa molecular relativa (Mr) se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida (15% acrilamida y 2.7% bis-acrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, EGPA-SDS) por el procedimiento de Laemmli (Nature 227, 680-685). El valor de Mr obtenido fué de 66000 en

- 23 -

ausencia de reductor y de 32000 para la cadena A y 34000 para la cadena B en presencia de reductor.

c) Secuencia amino-terminal de las cadenas polipeptídicas de nigrina 1 básica.

5 La secuencia amino-terminal de las dos cadenas polipeptídicas de la nigrina 1 básica se determinó como se indica en Arias y cols. (Arias y cols; Planta 186, 532-540 [1992]). Los resultados obtenidos fueron:

10 - Cadena A: Con el aminoácido del extremo amino-terminal bloqueado.

- Cadena B:

Ala Pro Xxx Tyr Pro Thr Xxx Xxx

1 5

(Xxx: significa que puede ser cualquier aminoácido).

15 d) Actividad N-glucosidasa sobre el ARN-r de la nigrina 1 básica.

La actividad N-glucosidasa de la nigrina 1 básica se determinó como liberación del fragmento de ARN-r como consecuencia de la acción de la anilina en medio 20 ácido sobre el ARN-r depurinado por la nigrina 1 básica. La liberación del fragmento de ARN-r se determinó incubando lisados de reticulocitos de conejo con Nigrina 1 básica como se indica a continuación. 100 μ l de lisados de reticulocitos de conejo se incubaron con 0,5 μ g de Nigrina 25 1 básica en solución conteniendo 2mM MgCl₂, 10 mM ditio-treitol, 50 mM KCl y 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), durante 15 min a 37°C. Despues el ARN-r se extrajo de estas mezclas de reacción con un volumen de fenol saturado 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), en presencia de 10 mM EDTA. La extracción con 30 fenol se realizó otras dos veces y finalmente el ARN-r se precipitó con dos volúmenes de etanol en solución 300 mM acetato sódico (pH 5.2), a -80°C durante 2h. A continuación se trató el ARN-r con 1 volumen de 2 M anilina (pH 4.5). La anilina se extrajo con éter dietílico (un volumen dos veces). El ARN-r se precipitó a continuación con dos

- 24 -

volúmenes de etanol y 300 mM acetato sódico (pH 5.2). El análisis electroforético del fragmento liberado se realizó como sigue. El precipitado de ARN-r obtenido en la última etapa se resuspendió en agua. 3 μ g de ARN-r en tampón de electroforesis se colocaron en cada uno de los pocillos del gel de poliacrilamida (4.85% acrilamida y 0.150 % de bisacrilamida preparado según Salustio y Stanley (J.Bio-l.Chem.265, 582-588 [1990]). La electroforesis se llevó a cabo a 15 mA durante 100 min en un sistema de minigeles (Mighty Small, Hoefer). El teñido del gel se realizó con 0.5 μ g/ml bromuro de etidio durante 20 min. La visualización se realizó con transiluminador de lámpara U.V a 312 nm.

15 e) Inhibición de la biosíntesis de proteínas.
Los estudios de inhibición de biosíntesis in vitro de proteínas se realizaron utilizando como sistema acelular lisado de reticulocito de conejo en las condiciones standard descritas en (Arias y cols., Planta 186, 532-540 [1992]). Los resultados se indican en la Tabla 2:

20 TABLA 2

Efecto de la nigrina 1 básica sobre la biosíntesis de proteínas en sistema acelular.

25	Sistema acelular	IC ₅₀ (ng/ml)
	Lisados de reticulocitos de conejo	1.80

30 IC₅₀ indica la concentración de proteína que provoca un 50% de inhibición de biosíntesis de proteínas.

f) Toxicidad en ratones.

Los estudios se llevaron a cabo en ratones de la raza Swiss de aproximadamente 30 g de peso.

35 Se les inyectaron intraperitonealmente 1,6 mg

- 25 -

de nigrina 1 básica por kg de peso corporal sin ocasionar ninguna muerte en el plazo de 15 días.

g) Actividad hemaglutinante de eritrocitos.

Los estudios de hemaglutinación se hicieron 5 en placas de 96 pocillos utilizando una solución de eritrocitos al 0.5% en un volumen final de 0.1 ml.

Aglutinación total de eritrocitos de sangre humana (mg por ml de proteína

10

Grupos sangíneos

	A	B	AB	0
Nigrina 1 básica	0.160	0.160	0.160	0.160

15

h) Relación inmunológica.

Anticuerpos policlonales obtenidos inmunizando conejos durante 1,5 meses con nigrina 1 básica reaccionan 20 con nigrina b, ebulina 1 y racemosina b, dando idea de la relación inmunológica existente entre esta familia de proteínas obtenidas de plantas del género Sambucus.

EJEMPLO 3 (Ebulina 1)

Este ejemplo se desglosa en ocho partes:

a) obtención de Ebulina 1 a partir de hojas de 25 Sambucus ebulus L.; b) determinación de la masa molecular aparente; c) Secuencia amino-terminal de las cadenas polipeptídicas de Ebulina 1; d) actividad N-glucosidasa sobre ARN; e) inhibición de la biosíntesis de proteínas; f) toxicidad en ratones; g) actividad hemaglutinante de 30 eritrocitos; h) relación inmunológica.

a) Obtención de Ebulina 1.

100 g de hojas de Sambucus ebulus L. se molieron con 1000 ml de solución 280 mM cloruro sódico y 5 mM fosfato monosódico (pH 7,5) 4°C durante 12 h. El extracto resultante se filtró a través de malla para queso 35

- 26 -

para eliminar los sólidos remanentes. El extracto líquido se centrifugó a 13000 rpm en rotor JA-14 (centrífuga Beckman J21) y se recogió el sobrenadante (990 ml). El fluido sobrenadante se aplicó a una columna cromatográfica (9.5 x 5 cm) cargada con 190 ml de Sepharose 6B tratada con ácido (250 ml de Sepharose 6B tratados con 0.1 N HCl durante 3 h a 50°) equilibrada con tampón de extracción. A continuación se lavó la columna con tampón de extracción hasta que la absorbancia a 280 nm descendió hasta la línea base. Entonces se aplicó una solución tampón de extracción conteniendo 200 mM D-galactosa. El pico de absorbancia se recogió y se concentró hasta 7.5 ml con membrana de Amicón YM 10. La solución concentrada de proteína se aplicó entonces a una columna Superdex 75 HiLoad equilibrada con 400 mM NaCl y 5 mM fosfato sódico (pH 7,5). El eluato rindió picos protéicos de unos veinte ml cada uno, siendo el último la Ebulina 1 (el pico de menor Mr) electroforéti-cante homogénea.

b) Determinación de la masa molecular aparente.

La masa molecular relativa (Mr) se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida (15% acrilamida y 2,7% bis-acrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, EGPA-SDS) por el procedimiento de Laemmli (Nature 227, 680-685). Los valores de Mr obtenidos fueron de 26000 para la cadena A y 30.000 para la cadena B, en presencia de reductor y 56.000 en su ausencia.

c) Secuencia amino-terminal de las cadenas polipeptídicas de ebulina 1.

30 La secuencia amino-terminal de las dos cadenas polipeptídicas de la ebulina 1 se determinó como se indica en Arias y cols. (Arias y cols; *Planta* 186, 532-540 [1992]). Los resultados fueron

- 27 -

- Cadena A:

Ile	Asp	Tyr	Pro	Ser	Val	Ser	Phe	Asn	Leu	Ala
1										10
Gly	Ala	Lys	Ser	Thr	Thr	Tyr	Arg	Asp	Phe	Leu
5										20

Lys Asn Leu

25

- Cadena B:

Asp	Gly	Glu	Thr	Xxx	Ala	Ile	Pro	Ala	Pro	Phe
10										10
Thr	Arg	Arg	Ile	Val	Gly	Xxx	Asp	Gly	Leu	Glu
15										20

Val Asp Pro

25

(Xxx: significa que puede ser cualquier aminoácido)

d) Actividad N-glucosidasa sobre el ARN-r de la Ebulina 1.

La actividad N-glucosidasa de la Ebulina 1 se determinó como liberación del fragmento de ARN-r como consecuencia de la acción de la anilina en medio ácido sobre el ARN-r depurinado por la Ebulina 1. La liberación del fragmento de ARN-r se determinó incubando 100 μ l de lisado de reticulocitos de conejo con Ebulina 1, como se indica a continuación. 100 μ l de lisados de reticulocitos de conejo se incubaron con 6.8 μ g de Ebulina 1 en solución conteniendo 2 mM MgCl₂, 10 mM ditiotreitol, 50 mM KCl y 20 mM Tris-HCl (pH 7,8), durante 15 min a 37°C. Despues el ARN-r se extrajo de estas mezclas de reacción con un volumen de fenol saturado de 100 mM Tris-HCl (pH 7,8), en presencia de 10 mM EDTA. La extracción con fenol se realizó otras dos veces y finalmente el ARN-r se precipitó con dos volúmenes de etanol en solución 300 mM acetato sódico (pH 5.2), a -80°C durante 2 h. A continuación se trató el

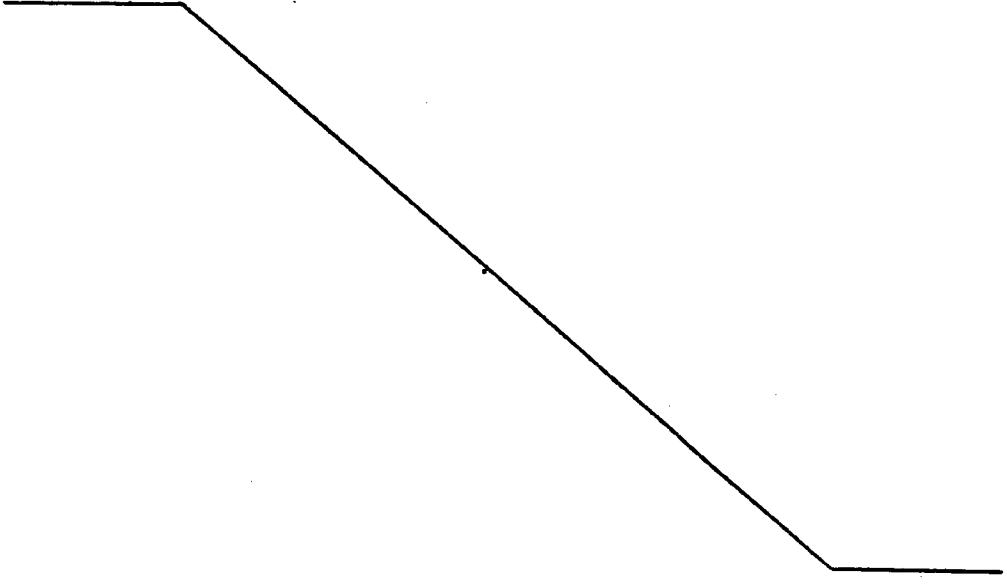
- 28 -

ARN-r con 1 volumen de 2 M anilina (pH 4.5). La anilina se extrajo con éter dietílico (un volumen dos veces). El ARN-r se precipitó a continuación con dos volúmenes de etanol y 300 mM acetato sódico (pH 5.2). El análisis electroforético del fragmento liberado se realizó como sigue: el precipitado de ARN-r obtenido en la última etapa se resuspendió en agua. 3 μ g de ARN-r en tampón de electroforésis se colocaron en cada uno de los pocillos del gel de poliacrilamida (4.85 %) acrilamida y 0.150 % de bisacrilamida preparado según Salustio y Stanley (J. Biol. Chem. 265, 582-588 [1990]). La electroforésis se llevó a cabo a 15 mA durante 100 min en un sistema de minigeles (Mighty Small, Hoefer). El teñido del gel se realizó con 0.5 μ g/ml bromuro de etidio durante 20 min. La visualización se realizó con transiluminador de lámpara U.V. a 312 nm.

e) Inhibición de la biosíntesis de proteínas.

Los estudios de inhibición de biosíntesis in vitro de proteínas se realizaron utilizando distintos sistemas acelulares en las condiciones standard descritas en las correspondientes referencias bibliográficas. Los resultados de un experimento típico se indican en la Tabla 3.

25



30

35

- 29 -

TABLA 3

Efecto de la Ebulina 1 sobre la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por distintos sistemas acelulares.

5

	Sistema acelular	IC ₅₀ (ng/ml)	ref.bibliográfica
	Lisados de reticulocitos de conejo	8.5	1
10	hígado de rata	15	1
	germen de trigo	>100000	1
	germen de Vicia sativa L.	>100000	1
	cerebro de rata	5	1
	Escherichia coli	>100000	3

15

Refs.: 1. Arias y cols. Planta 186, 532-540 [1992]; 2. Arias y cols. Phytochemistry 30, 3185-3187 [1991]. 3. Girbés y cols. Eur.J.Biochem, 67, 257-265 [1976]

20 IC₅₀ indica la concentración de proteína que provoca un 50% de inhibición de biosíntesis de proteínas en las condiciones standard de cada sistema acelular. Los experimentos se realizaron en las condiciones indicadas en las referencias bibliográficas.

25 f) Toxicidad en ratones.
Los estudios se realizaron en ratones de la raza Swiss de aproximadamente 30 g de peso.

Se les inyectaron intraperitonealmente 1,6 mg de ebulina 1 por kg de peso corporal sin ocasionar ninguna muerte en el plazo de 15 días.

30 g) Actividad hemaglutinante de eritrocitos.

Los estudios de hemaglutinación se hicieron en placas de 96 pocillos utilizando una solución de eritrocitos al 0,5% en un volumen final 0,1 ml.

35 Aglutinación total de eritrocitos de sangre humana (mg por ml de proteína)

- 30 -

Grupos sanguíneos

5

	A	B	AB	0
Ebulina 1	0.05	0.025	0.0125	0.0125

10

h) Relación inmunológica.

Anticuerpos policlonales obtenidos inmunizando conejos durante 1,5 meses con ebulina 1 reaccionaban con nigrina b, nigrina 1 básica y racemosina b, dando idea de la relación inmunológica existente entre esta familia de proteínas obtenidas del género *Sambucus*.

15

EJEMPLO 4 (Racemosina b)

Este Ejemplo se desglosa en siete partes:

20

a) obtención de racemosina b a partir de la corteza de *Sambucus racemosa* L.; b) determinación de la masa molecular aparente; c) actividad N-glucosidasa sobre el ARN; d) inhibición de la biosíntesis de proteínas; e) toxicidad en ratones; f) actividad hemaglutinante de eritrocitos; g) relación inmunológica.

30

a) Obtención de racemosina b.

250 g de corteza de *Sambucus racemosa* L. se trajeron con 2 l de solución 140 mM cloruro sódico y 5 mM fosfato monosódico (pH 7,2) a 4° C durante 12 h. La pasta resultante se filtró a través de malla para queso para eliminar los sólidos remanentes. El extracto líquido se acidificó a pH 4 con ácido acético glacial y los sólidos que aparecieron se eliminaron por centrifugación a 13.000 rpm durante 45 min a 0° C. El fluido eluído (aproximadamente 2 l) se sometió a cromatografía de intercambio iónico en S Sepharose Fast Flow (columna de 8.4x5 cm). La solución de equilibrado de columna fue acetato sódico 10 mM (pH 4,5). El fluido proteíco acidificado se aplicó a la columna. La parte no retenida a la columna se desechará. A continuación

35

- 31 -

la columna se lavó con solución de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) hasta que la absorbancia a 280 nm se redujo al mínimo. A continuación se lavó la columna con solución de fosfato monosódico 5 mM (pH 7). Los dos lavados se desecharon. Por 5 último la columna se eluyó con solución 1 M de cloruro sódico y 5 mM de fosfato monosódico (pH 7). La proteína eluída se sometió a diálisis frente a 5 mM de fosfato monosódico (pH 7). Esta preparación protéica se sometió a continuación a cromatografía de intercambio iónico en 10 gradiente de fuerza iónica en CM-Sepharose Fast Flow (columna de 4.7x2.6 cm) preequilibrada con solución de fosfato monosódico (pH 7). Primero se fijó la proteína y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 0,7 l de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 7) y 0,7 l de 15 solución 300 mM de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 7 ml por min y se recogieron fracciones de 10.5 ml. Se recogieron las fracciones 4 a la 15 que contenían racemosina b. Se juntaron las fracciones y se concentraron con AMICOM y membrana YM10 hasta un volumen de 10 ml. A 20 continuación el concentrado se sometió a cromatografía de exclusión molecular en HiLoad Superdex 75-FPLC equilibrada con solución de 0.4 M de cloruro sódico y 5 mM de fosfato monosódico (pH 7). La cromatografía se desarrolló en el mismo tampón y las fracciones correspondientes a racemosina b pura se juntaron.

b) Determinación de la masa molecular aparente.

La masa molecular relativa (Mr) se determinó 30 por electroforesis en geles de poliacrilamida (15% acrilamida y 2.7% bis-acrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, EGPA-SDS) por el procedimiento de Laemmli (Nature 227, 680-685). El valor de Mr obtenido fué de 58000 en ausencia de reductor y de 27500 para la cadena A y 29500 para la cadena B en presencia de reductor.

- 32 -

c) Actividad N-glucosidasa sobre el ARN-r de la racemosina b.

La actividad N-glucosidasa de la racemosina b se determinó como liberación del fragmento de ARN-r como consecuencia de la acción de la anilina en medio ácido sobre el ARN-r depurinado por la racemosina b. La liberación del fragmento de ARN-r se determinó incubando 100 μ l de lisado de reticulocitos de conejo con racemosina b como se indica a continuación: 100 μ l de lisados de reticulocitos de conejo se incubaron con 0.5 μ g de racemosina b en solución conteniendo 2 mM MgCl₂, 10 mM ditiotreitol, 50 mM KCl y 20 mM Tris-HCl (pH 7,8), durante 15 min a 37°C. Despues el ARN-r se extrajo de estas mezclas de reacción con un volumen de fenol saturado de 100 mM Tris-Hcl (pH 7,8), en presencia de 10 mM EDTA. La extracción con fenol se realizó otras dos veces y finalmente el ARN-r se precipitó con dos volúmenes de etanol en solución 300 mM acetato sódico (pH 5,2), a -80°C durante 2h. A continuación se trató el ARN-r con 1 volumen de 2 M anilina (pH 4.5). La anilina se extrajo con éter dietílico (un volumen dos veces). El ARN-r se precipitó a continuación con dos volúmenes de etanol y 300 mM acetato sódico (pH 5,2). El análisis electroforético del fragmento liberado se realizó como sigue. El precipitado de ARN-r obtenido en la última etapa se resuspendió en agua. 3 μ g de ARN-r en tampón de electroforesis se colocaron en cada uno de los pocillos del gel de poliacrilamida (4.85% acrilamida y 0.150% de bisacrilamida preparado según Salustio y Stanley (J.Biol.Chem. 265, 582-588 [1990])). La electroforesis se llevó a cabo a 15 mA durante 100 min en un sistema de minigeles (Mighty Small. Hoefer). El teñido del gel se realizó con 0.5 μ g/ml bromuro de etidio durante 20 min. La visualización se realizó con transiluminador de lámpara U.V. a 312 nm.

- 33 -

d) Inhibición de la biosíntesis de proteínas.

Los estudios de inhibición de biosíntesis in vitro de proteínas se realizaron utilizando como sistema acelular lisado de reticulocitos de conejo en las condiciones standard descritas en (Arias y cols., Planta 186. 532-540 [1992]. Los resultados se indican en la Tabla 4.

TABLA 4

Efecto de racemosina b sobre la biosíntesis de proteínas en sistema acelular.

Sistema acelular	IC ₅₀ (ng/ml)
------------------	--------------------------

Lisados de reticulocitos de conejo	0.54
------------------------------------	------

IC₅₀ indica la concentración de proteínas que provoca un 50% de inhibición de biosíntesis de proteínas.

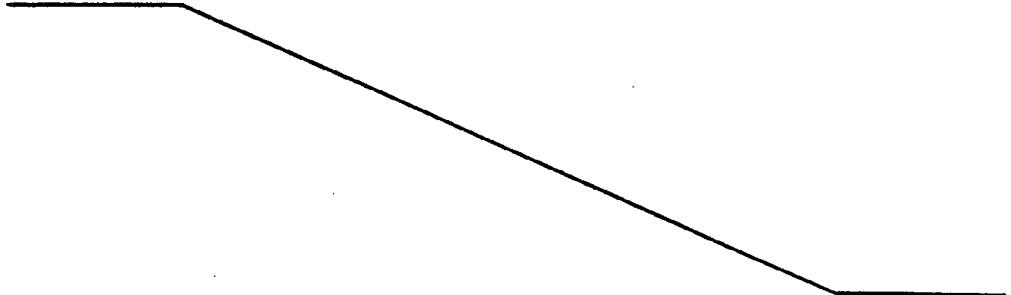
e) Toxicidad en ratones.

Los estudios se realizaron con ratones de la raza Swiss de aproximadamente 30 g de peso. Se les inyectaron intraperitonealmente 1,6 mg de racemosina b por kg de peso corporal, sin ocasionar ninguna muerte en el plazo de 15 días.

f) Actividad hemaglutinante de eritrocitos.

Los estudios de hemaglutinación se hicieron en placas de 96 pocillos utilizando una solución de eritrocitos al 0,5% en un volumen final de 0,1 ml.

30



35

- 34 -

Aglutinación total de eritrocitos de sangre humana (mg por
ml de proteína

		Grupos sanguíneos			
5		A	B	AB	0
	Racemosina b	6.8	3.4	3.4	5.4

10 g) Relación inmunológica.

Anticuerpos policlonales obtenidos inmunizando conejos durante 1,5 meses frente a ebulina l y nigrina b reaccionaban con racemosina b, dando idea de la relación inmunológica existente entre las proteínas de esta familia 15 obtenidas de plantas del género Sambucus.

REIVINDICACIONES:

1.- Nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de dos cadenas, no tóxicas en el ámbito extracelular, de origen vegetal capaces de interaccionar con el ácido ribonucléico y de provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas celulares y constituidas por dos cadenas A y B, de las cuales la cadena A posee actividad N-glucosidasa del ácido ribonucléico ribosómico y la cadena B posee actividad de lectina, unidas por puentes disulfuro; caracterizándose dichas nuevas proteínas porque, ligadas a una molécula transportadora (anticuerpo, hormona u otra proteína) reconocible por un receptor de membrana presente en la célula diana, permiten la actuación específica y selectiva de la cadena A sobre dichas células diana por inactivación del ácido ribonucléico de sus ribosomas, evitando sustancialmente el ataque indiscriminado de dichas RIPs a células no seleccionadas por la molécula transportadora, frente a las cuales carecen de toxicidad en el ámbito extracelular.

2.- Nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) no tóxicas de origen vegetal capaces de interaccionar con el ácido ribonucléico y de provocar la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares y constituidas por dos cadenas A y B, de las cuales la cadena A posee actividad N-glucosidasa del ácido ribonucléico ribosómico y la cadena B posee actividad de lectina, unidas por puentes disulfuro; caracterizándose dichas nuevas proteínas porque, ligadas a una molécula transportadora (anticuerpo, hormona u otra proteína) reconocible por un receptor de membrana presente en la célula diana, permiten la actuación específica y selectiva de la cadena A sobre dichas células diana por inactivación del ácido ribonucléico de sus ribosomas, evitando sustancialmente el ataque indiscriminado de dichas RIPs a células no seleccionadas por la molécula transportadora frente a las cuales

mas (RIPs), según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizadas porque son toxinas vegetales aisladas de plantas del género *Sambucus*.

15 4.- Nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas porque la proteína se denomina *Nigrina b* y se aísla de la corteza de *Sambucus nigra* L.

20 5.- Nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas porque la proteína se denomina *Nigrina 1* básica y se aísla de las hojas de *Sambucus nigra* L.

25 6.- Nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas porque la proteína se denomina *Ebulina 1* y se aísla de hojas de *Sambucus ebulus* L.

7.- Nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas porque la proteína se denomina *Racemosina b* y se aísla de corteza de *Sambucus racemosa* L.

30 8.- Nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), según la reivindicación 4, caracterizadas porque dicha *Nigrina b* presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 26.000 para la cadena A y de 32.000 para la cadena B en presencia de reductor y de 58.000 en su ausencia, y porque

- 37 -

sus cadenas poseen las siguientes secuencias de aminoácidos en el extremo amino-terminal:

- Cadena A:

Ile Asp Tyr Pro Ser Val Ser Phe Asn Leu Asp

5

1 5

10

Gly Ala Val Ser Ala Thr Tyr Arg Asp Phe

15

20

Leu Ser Asn

- Cadena B:

10 Asp Gly Glu Thr Xxx Thr Leu Xxx Thr Ser

1 5

10

Phe Thr Arg Asn Ile Val Gly Arg Asp Gly

15

20

Leu Xxx Val Asp

15 en las que Xxx representa cualquier aminoácido.

20

9.- Nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), según la reivindicación 5, caracterizadas porque dicha Nigrina 1 básica presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 66.000 en ausencia de reductor y de 32.000 para la cadena A y 34.000 para la cadena B en presencia de reductor y porque sus cadenas poseen las siguientes secuencias de aminoácidos en el extremo amino-terminal:

25

- Cadena A: aminoácido del extremo amino-terminal bloqueado.

- Cadena B:

Ala Pro Xxx Tyr Pro Thr Xxx Xxx

1 5

30

10.- Nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), según la reivindicación 6, caracterizadas porque dicha Ebulina 1 presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 26.000 para la cadena A y de 30.000 para la cadena B en presencia de reductor y de 56.000 en su ausencia, y porque

35

- 38 -

posee las siguientes secuencias de aminoácidos en el extremo amino-terminal:

- Cadena A:

Ile Asp Tyr Pro Ser Val Ser Phe Asn Leu Ala

5

1 5

10

Gly Ala Lys Ser Thr Thr Tyr Arg Asp Phe Leu

15

20

Lys Asn Leu

25

10

- Cadena B:

Asp Gly Glu Thr Xxx Ala Ile Pro Ala Pro Phe

1 5

10

Thr Arg Arg Ile Val Gly Xxx Asp Gly Leu Glu

15

20

15

Val Asp Pro

25

en las que Xxx representa cualquier aminoácido.

11.- Nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), según la reivindicación 7, caracterizadas porque dicha Racemosina b presenta una masa molecular relativa determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de 58.000 en ausencia de reductor, y de 27.500 para la cadena A y de 29.500 para la cadena B en presencia de reductor.

25

12.- Procedimiento para la obtención de nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de dos cadenas no tóxicas, según la reivindicación 1, mediante aislamiento de plantas no tóxicas, caracterizado porque comprende unas primeras operaciones de extracción de la parte correspondiente de la planta con una solución acuosa a base de cloruro sódico y fosfato monosódico, para obtener un extracto que (i) sea capaz de inhibir la síntesis de proteínas y (ii) tenga actividad aglutinante de eritrocitos humanos, seguido de concentración de los extractos y purificación de los mismos mediante técnicas de cromatogra-

- 39 -

fía de intercambio iónico y/o afinidad y de exclusión molecular.

13.- Procedimiento según la reivindicación 12, para la obtención de RIPs de dos cadenas no tóxicas de tipo ácido, caracterizado porque comprende obtener un extracto protéico crudo de la planta no tóxica previamente seleccionada con cloruro sódico y fosfato monosódico capaz de inhibir la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo y con actividad aglutinante de eritrocitos humanos; someter dicho extracto a cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 6B tratada con ácido y elución con D-galactosa o lactosa; someter los picos correspondientes a las proteínas a cromatografía de exclusión molecular; obtener los picos conteniendo las lectinas y las RIPs de dos cadenas no tóxicas y finalmente efectuar un análisis de inhibición de síntesis de proteínas para seleccionar el pico que inhibe dicha síntesis de proteínas.

14.- Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque la planta no tóxica pertenece al género *Sambucus*.

15.- Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque la RIP de dos cadenas no tóxica de tipo ácido es Nigrina b y se obtiene mediante las siguientes operaciones:

a) extraer corteza de *Sambucus nigra* L., previamente molida con una solución acuosa de NaCl y NaPO_4H_2 ;

b) filtrar el extracto líquido resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado;

c) aplicar el fluido sobrenadante a una columna para cromatografía de afinidad equilibrada con un tampón de extracción y lavar la columna con un tampón de extracción;

d) eluir la columna lavada con un tampón de extracción conteniendo D-galactosa y recoger la fracción

- 40 -

proteínica;

5 e) dializar y liofilizar la fracción proteínica obtenida y someterla a una cromatografía de exclusión molecular previamente disuelta en NaCl NaH₂PO₄, rindiendo el eluato tres picos de los cuales el segundo de ellos corresponde a la Nigrina b.

10 16.- Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque la RIP de dos cadenas no tóxica de tipo ácido es Ebulina 1 y se obtiene mediante las siguientes operaciones:

a) extraer las hojas de *Sambucus ebulus L.*, previamente molidas con una solución acuosa de NaCl y NaPO₄H₂;

15 b) filtrar el extracto líquido resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado;

c) aplicar el fluido sobrenadante a una columna para cromatografía de afinidad equilibrada con un tampón de extracción y lavar la columna con un tampón de extracción;

20 d) eluir la columna lavada con un tampón de extracción conteniendo D-galactosa y recoger la fracción proteínica;

25 e) concentrar la fracción proteínica y aplicarla a otra columna para cromatografía de exclusión molecular equilibrada con NaCl y NaH₂PO₄, rindiendo el eluato picos protéicos de los cuales el último de ellos corresponde a la Ebulina 1.

30 17.- Procedimiento según la reivindicación 12, para la obtención de RIPs de dos cadenas no tóxicas de tipo básico, caracterizado porque comprende obtener un extracto protéico crudo de la planta no tóxica previamente seleccionada con cloruro sódico y fosfato monosódico capaz de inhibir la síntesis de proteína en lisados de reticulocitos de conejo y con actividad aglutinante de eritrocitos humanos; someter dicho extracto a cromatografía de cambio

- 41 -

5 iónico de proteínas básicas sobre S-Sepharose FF seleccionando los picos protéicos que inhiben la síntesis de proteínas; someter los picos seleccionados a una segunda cromatografía sobre CM-Sepharose FF, seleccionando nuevamente los que inhiben la síntesis de proteínas para concentrarlos con Amicon y someterlos finalmente a una cromatografía de exclusión molecular.

10 18.- Procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado porque la planta no tóxica pertenece al género Sambucus.

15 19.- Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque la RIP de dos cadenas no tóxica de tipo básico es la nigrina 1 básica y se obtiene mediante las siguientes operaciones:

20 a) extraer las hojas de *Sambucus nigra* L, con una solución acuosa de NaCl y NaPO₄H₂;

b) filtrar la pasta resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado previamente acidulado;

25 c) someter el fluido obtenido previamente acidulado a una cromatografía de intercambio iónico, lavando primeramente la columna con acetato sódico y después con fosfato monosódico;

d) eluir la columna lavada con una solución de cloruro sódico y fosfato monosódico y recoger la fracción protéica;

30 e) someter dicha fracción protéica a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica separándose las fracciones que contienen la Nigrina 1 básica;

f) someter las fracciones anteriores concentradas a cromatografía de exclusión molecular para obtener la Nigrina 1 básica.

35 20.- Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque la RIP de dos cadenas no tóxica de tipo básico es la racemosina b y se obtiene mediante las

- 42 -

siguientes operaciones:

a) extraer la corteza de *Sambucus racemosa* con una solución acuosa de NaCl y NaPO₄H₂;

5 b) filtrar la pasta resultante a través de una malla y centrifugar el filtrado previamente acidulado;

c) someter el fluido obtenido previamente acidulado a una cromatografía de intercambio iónico, lavando primeramente la columna con acetato sódico y después con fosfato monosódico;

10 d) eluir la columna lavada con una solución de cloruro sódico y fosfato monosódico y recoger la fracción protéica;

15 e) someter dicha fracción protéica a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica, separándose las fracciones que contienen la Racemosina b;

f) someter las fracciones anteriores concentradas a cromatografía de exclusión molecular para obtener la Racemosina b.

20 21.- Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas de dos cadenas no tóxicas para la inactivación in vitro de ribosomas sensibles a la toxina.

25 22.- Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas de dos cadenas no tóxicas para la inactivación in vitro del ácido ribonucléico ribosómico de mamíferos.

30 23.- Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas en la construcción de conjugados con otras especies químicas destinados a inhibir la biosíntesis de proteínas por inactivación in vivo de ribosomas de organismos eucariontes.

35 24.- Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas de dos cadenas no tóxicas para inhibir la propagación funcional (in vivo y en células intactas aisladas) de ácido ribonucléico, en enfermedades provocadas o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido

- 43 -

ribonucléico (virus ARN).

25.- Utilización terapéutica de las proteínas inactivadoras de ribosomas de dos cadenas no tóxicas, bien solas o en forma de conjugado con otras especies químicas, 5 para inactivar células blanco específicas en seres humanos y animales de experimentación.

26.- Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas de dos cadenas no tóxicas, obtenidas por técnicas de clonación molecular para las aplicaciones 10 mencionadas en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

27.- Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas de dos cadenas no tóxicas, según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26 anteriores, en que 15 dichas proteínas se emplean modificadas químicamente por alquilación y/o tiolación.

28.- Utilización de la Nigrina b para la inactivación in vitro de ribosomas sensibles a la toxina.

29.- Utilización de la Nigrina b para la 20 inactivación in vitro del ácido ribonucléico ribosómico de mamíferos.

30.- Utilización de la Nigrina b en la construcción de conjugados con otras especies químicas destinados a inhibir la biosíntesis de proteínas por 25 inactivación in vivo de ribosomas de organismos eucariontes.

31.- Utilización de la Nigrina b para inhibir la propagación funcional (in vivo y en células intactas aisladas) de ácido ribonucléico en enfermedades provocadas 30 o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido ribonucléico (virus ARN).

32.- Utilización terapéutica de la Nigrina b bien libre, bien en forma de conjugado con otras especies químicas para inactivar células blanco específicas en seres 35 humanos y animales de experimentación.

- 44 -

33.- Utilización de la Nigrina b obtenida por técnicas de clonación molecular para las aplicaciones mencionadas en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

5 34.- Utilización de la Nigrina b según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, en que dicha Nigrina b se emplea modificada químicamente por alquilación y/o tiolación.

10 35.- Utilización de la Nigrina l básica para la inactivación in vitro de ribosomas sensibles a la toxina.

36.- Utilización de la Nigrina l básica para la inactivación in vitro del ácido ribonucléico ribosómico de mamíferos.

15 37.- Utilización de la Nigrina l básica en la construcción de conjugados con otras especies químicas destinados a inhibir la biosíntesis de proteínas por inactivación in vivo de ribosomas de organismos eucariontes.

20 38.- Utilización de la Nigrina l básica para inhibir la propagación funcional (in vivo y en células intactas aisladas) de ácido ribonucléico en enfermedades provocadas o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido ribonucléico (virus ARN).

25 39.- Utilización terapéutica de la Nigrina l básica bien libre, bien en forma de conjugado con otras especies químicas, para inactivar células blanco específicas en seres humanos y animales de experimentación.

30 40.- Utilización de la Nigrina l básica, obtenida por técnicas de clonación molecular para las aplicaciones mencionadas en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

35 41.- Utilización de la Nigrina l básica, según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 40, en que dicha Nigrina l básica se emplea modificada químicamente por

- 45 -

alquilación y/o tiolación.

42.- Utilización de la Ebulina 1 para la inactivación in vitro de ribosomas sensibles a la toxina.

5 43.- Utilización de la Ebulina 1 para la inactivación in vitro del ácido ribonucléico ribosómico de mamíferos.

10 44.- Utilización de la Ebulina 1 en la construcción de conjugados con otras especies químicas destinados a inhibir la biosíntesis de proteínas por inactivación in vivo de ribosomas de organismos eucariontes.

15 45.- Utilización de la Ebulina 1 para inhibir la propagación funcional (in vivo y en células intactas aisladas) de ácido ribonucléico en enfermedades provocadas o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido ribonucléico (virus ARN).

20 46.- Utilización terapéutica de la Ebulina 1 bien libre, bien en forma de conjugado con otras especies químicas, para inactivar células blanco específicas en seres humanos y animales de experimentación.

47.- Utilización de la Ebulina 1 obtenida por técnicas de clonación molecular para las aplicaciones mencionadas en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

25 48.- Utilización de la Ebulina 1, según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 47 en que dicha Ebulina 1 se emplea modificada químicamente por alquilación y/o tiolación.

30 49.- Utilización de la Racemosina b para la inactivación in vitro de ribosomas sensibles a la toxina.

50.- Utilización de la Racemosina b para la inactivación in vitro del ácido ribonucléico ribosómico de mamíferos.

35 51.- Utilización de la Racemosina b en la construcción de conjugados con otras especies químicas

- 46 -

destinados a inhibir la biosíntesis de proteínas por inactivación in vivo de ribosomas de organismos eucariontes.

5 52.- Utilización de la Racemosina b para inhibir la propagación funcional (in vivo y en células intactas aisladas) de ácido ribonucléico, en enfermedades provocadas o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido ribonucléico (virus ARN).

10 53.- Utilización terapéutica de la Racemosina b bien libre, bien en forma de conjugado con otras especies químicas, para inactivar células blanco específicas en seres humanos y animales de experimentación.

15 54.-Utilización de la Racemosina b obtenida por técnicas de clonación molecular para las aplicaciones mencionadas en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

20 55.- Utilización de la Racemosina b según cualquiera de las reivindicaciones 49 a 54, en que dicha Racemosina b se emplea modificada químicamente por alquilación y/o tiolación.

25 56.- Utilización de las proteínas inactivadoras de ribosomas de dos cadenas no tóxicas, según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 55, para la potencial terapia del cáncer y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/ES 94/00020

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 5	C07K15/10	C07K3/02
A61K37/02		

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BIOTECHNOLOGY vol. 10, no. 4 , April 1992 , NEW YORK US pages 405 - 412 FIORENZO STIRPE ET AL. 'Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects'</p>	23
A	<p>see abstract see page 406, left column, paragraph 3; table 2 see page 407, right column, paragraph 2 - page 408, left column, paragraph 1 see page 408, left column, paragraph 3 - right column, paragraph 3 see page 409, left column, paragraph 2 - right column, paragraph 1</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1,12,21, 24-26

<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.
-------------------------------------	------------------------------------------------------------

<input type="checkbox"/>	Patent family members are listed in annex.
--------------------------	--------------------------------------------

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 June 1994	09.08.94

Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/ES 94/00020

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY. vol. 22, no. 6, September 1993, DORDRECHT NL pages 1181 - 1186 TOMAS GIRBES ET AL. 'Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of <i>Sambucus nigra</i> L.' see abstract see page 1181, right column, paragraph 1 - page 1185, left column, paragraph 2 ----</p>	<p>1-4, 8, 12-15, 21, 22, 24, 28, 29, 56</p>
P,X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 268, no. 24, 25 August 1993, BALTIMORE, MD US pages 18195 - 18199 TOMAS GIRBES ET AL. 'Ebulin 1, a nontoxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from <i>Sambucus ebulus</i> L. leaves' see abstract see page 18195, right column, paragraph 3 see page 18196, left column, paragraph 2 see page 18197, right column, paragraph 1 - page 18199, right column, paragraph 1 -----</p>	<p>1-3, 6, 10, 12-14, 16, 21, 22, 24, 42, 43, 45, 56</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 94/00020

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Observation : Although claims 25,32,39,46,53 and part of claims 24,26,27,31, 33,34,40,41,45,47,48,52,54,55 (in the case of a method *in vivo*), relate to a method for treating animals or the human body, the search has been carried out on the basis of the supposed effects of the compound.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 94/00020

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION
CIP 5 C07K15/10 C07K3/02 A61K37/02

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 5 C07K A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
X	BIOTECHNOLOGY vol. 10, num. 4, Mayo 1992, NEW YORK US páginas 405 - 412 FIORENZO STIRPE ET AL. 'Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects'	23
A	ver resumen ver página 406, columna izquierda, párrafo 3; tabla 2 ver página 407, columna derecha, párrafo 2 - página 408, columna izquierda, párrafo 1 ver página 408, columna izquierda, párrafo 3 - columna derecha, párrafo 3 ver página 409, columna izquierda, párrafo 2 - columna derecha, párrafo 1 ---	1,12,21, 24-26

En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

- 'A' documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- 'E' documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- 'L' documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- 'O' documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- 'T' documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- 'X' documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- 'Y' documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- '&' documento que forma parte de la misma familia de patentes

2

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional
27 Junio 1994	09.08.94

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Montero Lopez, B

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°
PCT/ES 94/00020

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría*	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
P,X	<p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY. vol. 22, num. 6 , Septiembre 1993 , DORDRECHT NL páginas 1181 - 1186 TOMÁS GIRBÉS ET AL. 'Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of <i>Sambucus nigra</i> L.' ver resumen ver página 1181, columna derecha, párrafo 1 - página 1185, columna izquierda, párrafo 2 ---</p>	1-4,8, 12-15, 21,22, 24,28, 29,56
P,X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 268, num. 24 , 25 Agosto 1993 , BALTIMORE, MD US páginas 18195 - 18199 TOMÁS GIRBÉS ET AL. 'Ebulin 1, a nontoxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from <i>Sambucus ebulus</i> L. leaves' ver resumen ver página 18195, columna derecha, párrafo 3 ver página 18196, columna izquierda, párrafo 2 ver página 18197, columna derecha, párrafo 1 - página 18199, columna derecha, párrafo 1 -----</p>	1-3,6, 10, 12-14, 16,21, 22,24, 42,43, 45,56

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/ES 94/00020

Recuadro I Observaciones cuando no han podido efectuarse búsquedas sobre ciertas reivindicaciones (continuación del punto 1 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha establecido respecto de ciertas reivindicaciones, en virtud del Artículo 17.2)a), por las razones siguientes:

1. Reivindicaciones Nos.: debido a que se refieren a objetos para los que no se ha solicitado a esta Administración su búsqueda, concretamente: Observación: Aunque las reivindicaciones 25, 32, 39, 46, 53 y parcialmente las reivindicaciones 24, 26, 27, 31, 33, 34, 40, 41, 45, 47, 48, 52, 54, 55 (en caso de tratarse de un método en vivo), se refieren a un método de tratamiento de animales o del cuerpo humano, la búsqueda se ha realizado en base a los supuestos efectos del compuesto.
2. Reivindicaciones Nos.: debido a que se refieren a partes de la solicitud internacional que no cumplen con las exigencias prescritas, de forma que no puede realizarse una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. Reivindicaciones Nos.: debido a que son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con la segunda y tercera frases de la Regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta la unidad de la invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha encontrado invenciones múltiples en esta solicitud internacional, como se indica a continuación:

1. Debido a que todas las tasas adicionales de búsqueda exigidas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca todas las reivindicaciones para las que puede efectuarse la búsqueda.
2. Debido a que puede efectuarse la búsqueda respecto de todas las reivindicaciones susceptibles de búsqueda sin esfuerzo que justifique una tasa adicional, esta Administración no invita a pagar ninguna tasa adicional.
3. Debido a que sólo algunas de las tasas adicionales de búsqueda requeridas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca únicamente las reivindicaciones para las que fueron pagadas las tasas, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. El solicitante no pagó en su momento las tasas adicionales de búsqueda requeridas. En consecuencia, este informe de búsqueda internacional se restringe a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones; abarca las reivindicaciones Nos.:

Observación sobre protesta Las tasas de búsqueda adicional fueron acompañadas por protesta del solicitante.

Ninguna protesta acompañó al pago de las tasas de búsqueda adicional.